

高等学校教材

# 人体组织学与解剖学实验

(第三版)

辜清 郭炳冉 编

9-33

高等教育出版社

(京)112号

### 内 容 提 要

本书是为配合周美娟、段相林(主编)的《人体组织学与解剖学》第三版教材所编写的实验用教材。内容包括基本组织、各器官系统的大体解剖和显微结构、石蜡切片法、电镜的样品制备、细胞形态计量体视学参数的测算、HRP追踪神经联系法等24个实验。本次修订时压缩和更新了部分内容。

本书可作为高等学校生物学系实验用教材,也可供有关读者参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

人体组织学与解剖学实验/辜清,郭炳冉编.-3版.

-北京:高等教育出版社,1999

ISBN 7-04-007258-0

I.人… II.①辜… ②郭… III.①人体组织学-实验-高等学校-教材②人体解剖学-实验-高等学校-教材 IV.R  
32-33

中国版本图书馆CIP数据核字(1999)第02825号

书 名 人体组织学与解剖学实验(第三版)

作 者 辜 清 郭炳冉 编

---

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街55号 邮政编码 100009

电 话 010-64054588 传 真 010-64014048

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

经 销 新华书店北京发行所

排 版 高等教育出版社照排中心

印 刷 北京东晓印刷厂 版 次 1981年10月第1版

开 本 787×1092 1/16 1999年6月第3版

印 张 9 印 次 1999年6月第1次印刷

字 数 210 000 定 价 7.90元

---

凡购买高等教育出版社图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请在所购图书销售部门联系调换。

**版权所有 侵权必究**

## 第三版前言

《人体组织学与解剖学实验》第三版是配合周美娟、段相林(主编)的《人体组织学与解剖学》第三版教材所编写的实验用教材。

此次再版,根据多动手、少而精、反映学科发展方向和面向 21 世纪的原则对原实验教材进行了修订、改编。在实验内容的安排上基本保留了原教材的框架,对部分实验内容进行了压缩。为适应学科的发展,主要增加了一些让同学多动手操作的实验技术与方法方面的内容,如:电镜样品的制备、形态计量体视学参数的测算、HRP 追踪神经联系法等,附录中也增加了生物塑化标本等解剖学新技术的介绍。

对于全书中所出现的名词基本上采用了全国自然科学名词审定委员会公布的规范名词,少数名词在组织学与解剖学中的定名不相统一,我们选取了其中一般多年习惯应用的名词使用于本教材中。此次修订和改编还对附图进行了重绘,并增加了一些附图。

本教材的实验一至八、十二至十四、二十至二十四及附录一、二、六、九、十、十二、十三由南昌大学辜清编写;实验九至十一、十五至十九及附录三至五、七、八、十一由山东曲阜师范大学郭炳冉编写。全书由辜清负责统稿。

本书在编写过程中得到南昌大学和山东曲阜师范大学的大力支持,得到周美娟、段相林教授以及高等教育出版社生物编辑室编辑们的热情帮助,在此一并表示诚挚谢意。

由于编者水平所限,书中难免有不足之处,恳请读者指正。

编者

1998 年 10 月

# 目 录

实验一	石蜡切片法 .....	1
实验二	透射电镜的样品制备 .....	6
实验三	扫描电镜的样品制备 .....	11
实验四	上皮组织 .....	14
实验五	结缔组织 .....	18
实验六	血与肌肉组织 .....	22
实验七	神经组织 .....	26
实验八	细胞形态计量体视学参数的测算 .....	29
实验九	骨骼 .....	34
实验十	骨骼肌 .....	39
实验十一	循环系统 .....	43
实验十二	免疫系统 .....	48
实验十三	消化系统的大体解剖结构 .....	51
实验十四	消化系统的显微结构 .....	55
实验十五	呼吸系统 .....	60
实验十六	泌尿系统 .....	63
实验十七	生殖系统 .....	66
实验十八	内分泌系统 .....	70
实验十九	感觉器与皮肤 .....	72
实验二十	脊髓的构造与脑干的外形 .....	77
实验二十一	脑干的内部结构 .....	81
实验二十二	间脑、小脑与端脑 .....	88
实验二十三	周围神经系统 .....	94
实验二十四	HRP 追踪神经联系法 .....	98
附录	.....	101
附录一	观察显微玻片标本应注意的事项 .....	101
附录二	显微摄影术 .....	103
附录三	尸体的收集、消毒、防腐、固定和保存 .....	106
附录四	解剖操作的基本方法 .....	109
附录五	骨骼标本的收集、处理和保存 .....	112
附录六	浸制解剖标本的涂色 .....	115
附录七	血管灌注标本的制作 .....	116
附录八	透明标本的制作 .....	118

附录九 干燥标本的制作 .....	121
附录十 铸型标本的制作 .....	123
附录十一 生物塑化技术 .....	125
附录十二 脑和脊髓厚片染色标本的制作 .....	128
附录十三 内耳标本的制作 .....	130
参考文献 .....	133

# 实验一 石蜡切片法

## 【目的和内容】

简要介绍石蜡切片的制作和苏木精(hematoxylin)、伊红(eosin)染色(简称 H-E 染色)方法,借以了解石蜡切片制作的基本原理和一般方法。

进行组织学研究,必须把活的组织或器官制作成显微玻片标本,以便在显微镜下进行观察。显微玻片标本的制作方法众多,但基本要求是尽量保持原结构的真相,应用不同的染色方法,使内部结构清晰易见。

石蜡切片法是最常用的一种显微玻片标本的制作方法。其制作过程包括以下步骤:取材、固定、冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片、烤片、脱蜡、复水、染色、脱水、透明和封固等。

## 【材料和用具】

蛙或小白鼠。

95% 及无水酒精、固定剂、蛋白甘油、染色液、盐酸酒精、二甲苯、切片石蜡、中性树胶、氨水。

解剖器一套<sup>①</sup>、单面刀片、切片刀、切片机、载玻片、盖玻片、标本瓶、烧杯、量筒、漏斗、染色缸、树胶瓶、酒精灯、毛笔、绘图纸、滤纸、标签纸、熔蜡箱(或恒温箱)、展片台(或烫板)、小木块、蜡带盒、烤片盒、切片托盘、显微镜。

## 【操作】

### 一、试剂的配制

#### (一) 70% 酒精、80% 酒精、90% 酒精

95% 以下的各级酒精是用 95% 酒精加蒸馏水稀释而成的。简单的稀释方法是:所需稀释的酒精是多少,就量取多少毫升 95% 的酒精,再加蒸馏水至该酒精的 95 ml 即可。例如,配制 70% 酒精,就量取 70 ml 95% 酒精,然后加入蒸馏水至 95 ml 即成。

#### (二) 固定剂

常用的固定剂有 10% 福尔马林、Bouin 液和 Zenker 液等。Bouin 液在组织学制片技术方面应用甚广,其配方如下:

苦味酸饱和水溶液	75 ml
福尔马林	25 ml
冰醋酸	5 ml

#### (三) 蛋白甘油

蛋白甘油是粘贴蜡片用的粘片剂。配法如下:取一新鲜鸡蛋的蛋清,滤去泡沫,加入等量甘油,搅拌均匀,再加入一小粒麝香草酚防腐。

#### (四) 染色液

<sup>①</sup> 本书所用“解剖器一套”包括:解剖刀、解剖剪、解剖镊、解剖针。

以 H-E 染色为例,需配制苏木精染液和伊红染液。

1. 苏木精染液 苏木精是一种碱性染料,它可将核染色质染成蓝紫色。配方有多种,现介绍 Harris 苏木精的配制:

甲液:苏木精	0.5 g
95%酒精	5.0 ml
乙液:硫酸铝钾(或硫酸铝铵)	10 g
蒸馏水	100 ml
氧化汞	0.25 g
冰醋酸	几滴

先将甲液溶解,再将乙液的硫酸铝钾溶于蒸馏水中,并加热使溶解,然后将甲、乙两液混合煮沸,离开火焰后缓缓加入氧化汞。待冷却后过滤,加入几滴冰醋酸即成。

2. 伊红染液 伊红是一种酸性染料,它可将多种细胞的胞质染成粉红色或红色。将 0.5 g 伊红溶于 100 ml、95%酒精中即成伊红染液。

#### (五) 盐酸酒精

盐酸酒精用于分色。配制方法是在 100 ml 70%酒精中加入 1ml 盐酸。

### 二、取材和固定

固定的目的在于保存组织内细胞原有的结构和形态,使其与生活时相似,因此要求所取的材料越新鲜越好。把动物杀死后应立即割取组织块,并快速投入固定剂中。

将蛙或小白鼠快速剪去头部,打开腹腔,用锐利的刀片割取小块组织(肝、肠等)。组织块的大小以厚度不超过 5 mm 为宜。然后,将取下的组织块迅速投入 Bouin 液中。固定时间为数小时到 24 小时(需视组织块的大小而定)。

### 三、冲洗

经固定的材料,根据所使用固定剂的不同,分别用水或酒精冲洗,以洗去固定剂。固定剂留在组织中会有碍染色。

用 Bouin 液固定的材料,可直接移入 70%酒精中,多换几次酒精进行冲洗,直至材料无黄色时为止。也可在酒精中加入几滴氨水或饱和碳酸锂水溶液,以迅速洗去黄色。

冲洗后的材料若暂时不制片,可保存在 70%酒精中。

### 四、脱水

柔软的组织是不易切成薄片的,故必须增加组织的硬度。石蜡切片法就是使石蜡渗入组织,以达到增硬的作用。水与石蜡是不相混合的,因此,在浸蜡、包埋前须将组织中的水分完全除去,这一步骤即为脱水。

脱水采用脱水剂脱水,常用的脱水剂是酒精。脱水时先从低浓度的酒精开始,然后,由低到高递增浓度,直至无水酒精。具体方法是:将材料依次经 70%酒精、80%酒精、95%酒精(I)、95%酒精(II)、无水酒精(I)和无水酒精(II),在各级酒精中分别历时 1~2 h。脱水应彻底,否则材料不能透明,影响石蜡的渗入,致使难以切片。

### 五、透明

酒精与石蜡也不能混和,因此,脱水后的材料在浸蜡前,还必须经过透明剂透明。透明剂既可替代组织中的酒精,又能溶解石蜡,以利石蜡的渗入。二甲苯是常用的一种透明剂。

将脱水后的材料依次经 1:1 无水酒精与二甲苯、二甲苯 (I) 和二甲苯 (II), 在各液中历时 0.5~2 h, 务使组织达到透明为止。

### 六、浸蜡

将已透明的材料移入熔化的石蜡内浸渍即为浸蜡。浸蜡的目的是去除组织中的透明剂, 而使石蜡渗入整个组织, 获得一定的硬度, 以便切成薄的切片。

先将装有熔点为 56~58℃ 石蜡的三个蜡杯放在熔蜡箱内熔化, 并使熔蜡箱的温度保持恒定 (约 58℃ 左右), 切勿太高或过低。

然后将透明了的材料依次放入蜡杯 (I)、蜡杯 (II) 和蜡杯 (III)。浸蜡时间视材料大小而定, 一般的浸蜡时间为 2~4 h 左右。

### 七、包埋

将浸蜡后的材料包埋于石蜡中, 并使它凝固成蜡块, 这一过程称为包埋。

包埋前, 视组织块的大小先用绘图纸折成一纸盒, 作为包埋的模具。纸盒折法如下 (图 1): 先折 1、2 线, 次折 3、4 线, 然后使 *a*、*b* 两线重叠, 折出 5 线, 同法折出 6 线, 再折 *c* 线。最后依上法折出 7、8 线及 *d* 线即成。

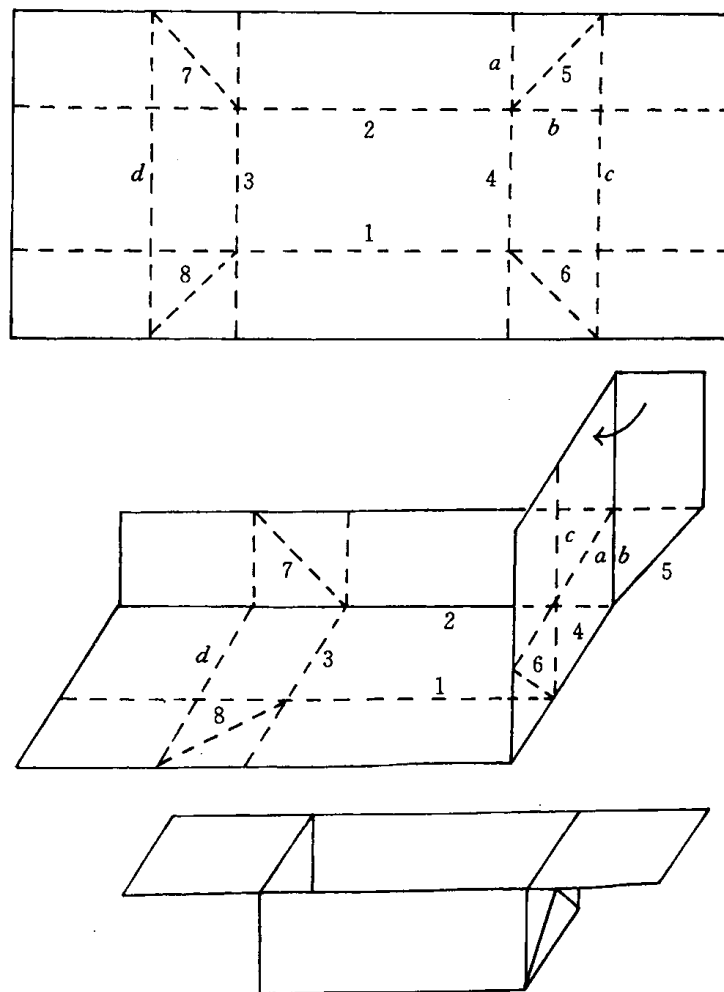


图 1 包埋纸盒的折法及折成的包埋纸盒

将纸盒盛满已熔化的石蜡, 随即将蜡杯 (III) 中已浸蜡的材料放入其中, 应注意使组织块的欲



切片的面朝向盒底,位置放正。然后迅速将纸盒半浸于冷水中,待石蜡表面凝结后,将纸盒全部浸入水中冷却。石蜡全部凝固后,拆去纸盒即成蜡块。组织在蜡块中可长期保存。

## 八、切片

切片前,先用单面刀片将蜡块修整成切片面上下两边平行的方形或梯形。应注意使切片面上下两边平行,否则切出的蜡带弯曲不直,或无法连成带状。

将修整后的蜡块用蜡粘在小木块上,小木块装在切片机上,以待切片。

在旋转式切片机上将蜡块切成4~8 $\mu$ m厚的薄片。切下的薄片会连成蜡带。用毛笔轻托轻取蜡带,放在蜡带盒内备用。

## 九、贴片和烤片

用小玻棒蘸取一点蛋白甘油滴于一干净的载玻片上,用手指涂匀,并加几滴蒸馏水于载玻片上。将蜡带按要求切成适当长度的蜡片,然后用小镊子将蜡片轻放在载玻片的水面上,再把载玻片放在展片台上(温度为45 $^{\circ}$ C左右)。蜡片受热后,即慢慢展平。待完全展平后,用解剖针将切片位置拨正,倾去载玻片上的余水后,将其放在烤片盒中置于50 $^{\circ}$ C左右恒温箱内烤干。

## 十、脱蜡、复水和染色

染色剂多为水溶液,故切片染色前必须先经脱蜡、复水等步骤。染色方法众多,对H-E染色而言有下列步骤:

### (一) 脱蜡

将烤干的切片依次放入二甲苯(I)和二甲苯(II)中,各历时5~10 min,以溶去切片上的石蜡。

### (二) 复水

复水是将脱蜡后的切片经逐渐下降的各级浓度酒精至水的过程,即将二甲苯(II)中取出的切片依次移入无水酒精、95%酒精、80%酒精、70%酒精和蒸馏水,在各液中停留1~5 min。

### (三) 染色

1. 将蒸馏水洗涤后的切片移入Harris苏木精染液中10~30 min,使细胞核着色。
2. 用自来水洗去切片上残余的染液。
3. 用盐酸酒精分色数秒钟。分色就是褪去细胞质等不应着色部分的颜色,而使细胞核的着色清晰适度。分色时需用显微镜检查切片的分色效果,保证分色适度。
4. 入1%氨水或自来水浸洗,使切片颜色呈蓝色。
5. 在蒸馏水中浸片刻。
6. 切片依次入70%酒精、80%酒精和90%酒精,各历时1~2 min。
7. 入伊红染液,染2~5 min,使细胞质着色。

## 十一、脱水

切片依次入95%酒精(I)、95%酒精(II)、无水酒精(I)和无水酒精(II),在各液中停留1~5min。

## 十二、透明

切片入1:1无水酒精与二甲苯、二甲苯(I)和二甲苯(II),在各液中停留1~5 min。

## 十三、封固

将切片从二甲苯(II)中取出,用纸或布擦去材料周围的二甲苯。在材料中央滴一小滴中性

树胶,然后,用镊子加盖盖玻片。盖盖玻片时注意防止气泡出现。

切片封好后,放在切片托盘上待树胶干燥。贴上标签,写明切片名称,即可用来观察。

染色结果:细胞核呈鲜艳的蓝色,细胞质及细胞间质呈粉红至红色。

### **【思考题】**

1. 制片是一个连续的操作过程,往往要连续几天才能完成,因此,事先一定要制订工作日程计划,应按顺序进行工作。如不能一次完成制片全过程,可在哪几个步骤时中断操作,保存组织?
2. 为什么脱水不彻底就会影响到透明的程度,以至影响蜡块的质量?

## 实验二 透射电镜的样品制备

### 【目的和内容】

简要介绍超薄切片技术,借以了解透射电镜的样品制备方法。用透射电镜观察组织细胞的超微结构,超薄切片标本的制备是个关键。它要求将生活状态下细胞的细微结构完好真实地保存下来。超薄切片技术的基本原理和步骤与石蜡切片法基本相似,包括取材、固定、浸洗、脱水、浸透、包埋、聚合、切片及染色等步骤。

### 【材料和用具】

大白鼠或小白鼠。

戊二醛、锇酸、磷酸缓冲液、醋酸-巴比妥缓冲液、双蒸水、丙酮、环氧树脂 618 或 Epon 812、十二碳烯琥珀酸酐(也称十二烷基琥珀酸酐, dodeceny succinic anhydride, 简称 DDSA)、甲基内次甲基四氢苯二甲酸酐(也称六甲酸酐, methyl nadic anhydride, 简称 MNA, 或 nadic methyl anhydride, 简称 NMA)、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, 简称 DBP)、2,4,6-三(二甲氨基甲基)苯酚[2,4,6-tris-(dimethyl aminomethyl)phenol, 简称 DMP-30]、Formvar(聚乙烯醇缩甲醛)、氯仿、醋酸双氧铀、硝酸铅、柠檬酸钠、50%乙醇。

注射器、烧杯、青霉素小瓶、试剂瓶、载玻片、4~6 mm 厚硬质玻璃、酸度计、恒温箱、冰箱、解剖器一套、眼科剪、眼科镊、滤纸、牙签、双面刀片、铜网、医用胶囊、胶带。

### 【操作】

#### 一、试剂的配制

除包埋剂外,所用试剂最好在使用的前一天配好置冰箱中(4℃)备用。

#### (一) 磷酸缓冲液

##### 1. Sørensen 磷酸缓冲液

A 液: 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35.61 g
(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	53.65 g)
(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	71.64 g)
双蒸水	加至 1 000 ml

B 液: 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27.60g
(或 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	31.21g)
双蒸水	加至 1 000 ml

A 液与 B 液按下表比例混合后,即得所需 pH 的缓冲液,若再用双蒸水将溶液稀释 1 倍,则配得 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液。

磷酸缓冲液配制表

pH(25℃时)	7.0	7.1	7.2	7.3	7.4	7.5
A液/ml	61	67	72	77	81	84
B液/ml	39	33	28	23	19	16

## 2. Palade 醋酸 - 巴比妥缓冲液

巴比妥钠	2.89 g
无水醋酸钠	1.15 g
(或含 3 分子结晶水的醋酸钠)	1.90 g
蒸馏水	加至 100 ml

此液较稳定,4℃下可保存数月。

## (二) 固定剂

1.1%~5%戊二醛固定剂 市售戊二醛多为 25%水溶液,可按下表配制所需的戊二醛固定剂:

戊二醛固定剂配制

所需的戊二醛(%)	1	1.5	2	2.5	3	4	5
0.2 mol/L 磷酸缓冲液, pH=7.2~7.4/ml	50	50	50	50	50	50	50
25% 戊二醛水溶液/ml	4	6	8	10	12	16	20
加双蒸水至/ml	100	100	100	100	100	100	100

2. 钨酸固定剂 钨酸毒性较大,应在通风橱内配制,一般用双蒸水配成 2% 贮存液。固定用 1% 钨酸溶液,其配法较多,现介绍两种如下:

## (1) Palade 钨酸固定剂

2% 钨酸贮存液	25 ml
Palade 醋酸 - 巴比妥缓冲液	10 ml
0.1 mol/L 盐酸	10 ml
双蒸水	5 ml

混合后,用酸度计测定,调节溶液的 pH 至 7.2~7.4。

## (2) 钨酸磷酸缓冲液固定剂:

2% 钨酸贮存液	25 ml
0.2 mol/L 磷酸缓冲液, pH=7.2~7.4	25 ml

## (三) 包埋剂

常选用环氧树脂 618 或 Epon812。

## 1. 环氧树脂 618 的配方

环氧树脂 618	6 ml
----------	------

DDSA	4 ml
DBP	0.3~0.8 ml(夏季减半)
DMP-30	0.1~0.2 ml(临用时加入)

## 2. Epon812 的配方

A 液: Epon812	10 ml
DDSA	16 ml
B 液: Epon812	10 ml
MNA	8.9 ml

分别将 A 液、B 液配好,然后根据不同的硬度要求量取不同比例的 A、B 液。A 液多则包埋块软, B 液多则包埋块硬。一般在冬季 A、B 液的配制比例为 1:4,夏季为 1:9。混合 A、B 液后,以 1%~2% 的容积比加 DMP-30,充分搅拌。

### (四) 染色液

#### 1. 醋酸双氧铀染色液

醋酸双氧铀	2 g
50% 乙醇	100 ml

染色液呈淡黄色,应避光保存。出现絮状沉淀或变色时,应废弃不用。

#### 2. 柠檬酸铅染色液

硝酸铅	1.33 g
含 2 分子结晶水的柠檬酸钠	1.76 g
蒸馏水	30 ml

放入 50 ml 容量瓶中,用力振荡 30 min 后,溶液呈乳白色浑浊液。加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 8 ml,溶液变为透明液,用蒸馏水定容至 50 ml。

## 二、取材与固定

动物麻醉或直接杀死后迅速取材,用锋利的眼科剪剪取一小块组织放在预先冷却(4℃左右)的固定剂中,然后取出置一清洁的载玻片上,滴一滴预冷的固定剂在组织块上。再用锋利的刀片将材料修切成小于 1 mm<sup>3</sup> 的小块。炎热的夏天需在载玻片下放置冰块。

将修切好的组织块用牙签移入盛有固定剂的青霉素小瓶中。贴上标签,注明所取材料及日期。

固定的方法常用戊二醛、锇酸双固定法,先用 3%~5% 戊二醛固定剂进行前固定,4℃ 下固定 24 h,然后在 4℃ 下用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.2~7.4)浸洗 4 次,每次 10 min(可在最后一次浸洗液中置冰箱过夜)。再用锇酸在 4℃ 下进行后固定 1~2h。固定时间不宜过长,否则材料易变脆。

对一些对缺氧敏感的器官,如脑等,最好先灌流,即从心脏或动脉处注入戊二醛固定剂。然后取材,再将组织切成小块继续作常规的双固定。

## 三、浸洗与脱水

用磷酸缓冲液(pH=7.2~7.4)进行浸洗,在 4℃ 下洗 4 次,每次 10 min。组织块经彻底浸洗

后,可按下列顺序进行脱水。

依次入 50% 丙酮、70% 丙酮、80% 丙酮和 90% 丙酮,4℃ 下每液 15~20 min,再在室温下入纯丙酮(2~3 次),每次 10~15 min。如当天不能完成后续的浸透、包埋等步骤时,可置于 70% 丙酮中过夜,决不能在高浓度的丙酮中过夜。

#### 四、浸透与包埋

脱水后,在室温、相对湿度不超过 75% (尽可能干燥)的条件下,将组织块置各级浸透液中逐级浸透至包埋。步骤如下:

1. 入 1:1 丙酮和包埋剂中浸透 1 h。
2. 入 1:3 丙酮和包埋剂中浸透 6~10 h(至少需 3 h)。
3. 入纯包埋剂中(35~37℃)浸透 5 h 或过夜。

包埋时,可先用注射器注入少量包埋剂于已烘干的医用胶囊中,再用牙签将浸透的组织块挑起,放入胶囊的底部,然后将胶囊灌满包埋剂,放上标明组织块名称的标签。包埋剂应在临用时配制。

#### 五、聚合

将包埋好的胶囊置 60℃ 温箱中经 48 h,变硬后即完成聚合。加温聚合也可从 37℃ (12 h)、45℃ (12h)、60℃ (24 h)依次逐步进行。

#### 六、包埋块的修整

聚合后的胶囊用 50℃ 左右的热热水浸泡后,剥去胶囊即得组织包埋块。包埋块若暂不切片应放在有盖小瓶中,再放入干燥器内保存,以防包埋块返潮变软。

切片前需修整包埋块,将包埋块夹在样品夹内,先用刀片粗修,然后在实体镜下或用专门的修块机细修。

修整时,先削去顶端的包埋剂暴露组织,然后沿组织的四个边修,使之成为一个四边形的锥体。切片面要求修得较光滑,呈梯形或长方形,面积以 1 mm<sup>2</sup> 左右为宜。

#### 七、制膜

光学显微镜的切片标本是放在载玻片上进行观察的,而超薄切片标本要耐受电子束的轰击,需放在载网(常用的为铜网)上进行观察。载网上还需附有支持膜,支持膜通常选用 Formvar(聚乙烯醇缩甲醛)膜。制备方法如下:

1. 制备 0.2%~0.4% 的 Formvar 氯仿溶液作为制膜液。
2. 用洁净的载玻片浸入制膜液中静置后取出,倾斜放置,干后玻片上即结有一层很薄的膜。
3. 用锋利的刀片或针头沿玻片周缘将膜划破,放入蒸馏水中,使膜漂浮于水面。
4. 将洗净的铜网按适当间距排于膜表面,再用滤纸贴附于铜网上,当滤纸湿润时,用镊子夹住滤纸边缘,将带有铜网的滤纸从水面捞起,晾干后备用。

#### 八、切片与切片的捞取

切片用玻璃刀切片,玻璃刀可选用 4~6 mm 厚的硬质玻璃手工或用专用的制刀机制备。制成的玻璃刀呈三角形,其斜面锐利的一端即为刀刃面。在刀刃下端的斜面上,要用胶带做一刀槽,底边用石蜡封死,刀槽内盛蒸馏水,使切下的切片可漂浮于水面上。

切片时,将修整过的包埋块装在超薄切片机上夹紧,安好玻璃刀,调节好角度再进行切片。切片的厚度可利用切片的干涉色进行判断,一般以银灰色的切片为好,其厚度为 50 nm 左右。

使用用眼睫毛制作的睫毛针将所需的切片集在一起,把蘸有氯仿的滤纸放在切片的上方,利用氯仿蒸气使切片展平,然后用载网捞取。

捞取切片可用镊子夹持附有支持膜的铜网,使膜面向下与切片迅速接触,让切片贴附于铜网上,把铜网移出水面置无尘处晾干后即可染色。

### 九、染色

未经染色的切片,在透射电镜下观察反差较小,染色可提高样品的反差,显示出清晰的超微结构。一般是用重金属盐来达到染色的目的,最常用的方法为醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染法。染色在蜡盘(可用培养皿灌石蜡制成)上进行,其步骤如下:

1. 将醋酸双氧铀染色液逐滴加在蜡盘上。
  2. 把铜网附有切片的一面与醋酸双氧铀染色液表面相接触,染 30 min。
  3. 取出铜网,经 3 次蒸馏水漂洗后用滤纸吸干。
  4. 用另一蜡盘,逐滴将柠檬酸铅染色液加在蜡盘上,并在蜡盘四周放上几粒固体氢氧化钠,以防染色液产生沉淀。
  5. 将经醋酸双氧铀染色后的铜网有材料的一面与柠檬酸铅染色液表面相接触,染 30min。
  6. 取出铜网,经 3 次蒸馏水漂洗后用滤纸吸干置干燥器中。
- 经以上步骤制作的标本即可用透射电镜观察。

### 【思考题】

1. 超薄切片与石蜡切片有什么不同?
2. 超薄切片有哪些主要步骤?

## 实验三 扫描电镜的样品制备

### 【目的和内容】

简要介绍扫描电镜样品的一般制备方法。扫描电镜要求样品没有水分和具有良好的导电性能。扫描电镜样品制备与超薄切片技术有相似之处,包括取材、固定、浸洗、脱水、干燥及镀膜等步骤。

### 【材料和用具】

大白鼠或小白鼠。

戊二醛、锇酸、磷酸缓冲液、丙酮、双蒸水、醋酸异戊酯、液体 CO<sub>2</sub>。

烧杯、青霉素小瓶、试剂瓶、冰箱、解剖器一套、牙签、双面刀片、载玻片、扫描电镜样品台、导电胶或双面胶带、临界点干燥仪、离子溅射仪。

### 【操作】

#### 一、试剂的配制、取材、固定、浸洗与脱水

上述步骤与透射电镜样品制备的相应步骤基本相同(见实验二)。扫描电镜样品取材的大小,可根据观察要求和样品情况适当增大,其直径最大不宜超过 5 mm,高度在 3~5 mm 之间。

#### 二、干燥

干燥是扫描电镜样品制备中的关键性措施,扫描电镜要求样品不含水分。经脱水处理的样品,水分为脱水剂取代,脱水剂成了样品中所含的液态成分。有液态成分存在,样品经挥发方式干燥时,受表面张力的影响,会导致样品变形和破坏样品的微细结构,所以干燥时要设法使样品不受或少受表面张力的影响。干燥的方法很多,目前扫描电镜样品的最佳干燥方法是临界点干燥法(critical point drying method),它可使样品在不受表面张力的影响下被干燥,对样品的微细结构保存得最好。

液体在室温下一般都有明显的气-液两相的界面。在密闭的容器中,若温度增高,液相会加速蒸发,气相因不能溢出而使压力逐渐增大,压力增大可导致液相密度下降,气相密度增加。当温度和压力增加到某一特定的值时,气-液两相的密度相等,气-液两相的界面消失,表面张力为零,这种状态为临界状态。临界状态下的温度和压力分别称为临界温度和临界压力。利用临界状态,适时排除密闭容器中的气体,可使处于其中的样品在不受表面张力的影响下而得以干燥,即为临界点干燥。不同的液体都有各自的临界温度和临界压力,故应选择适宜的液体作为媒介液,和样品一起在密闭容器中进行临界点干燥。常用的媒介液有液体 CO<sub>2</sub> 和氟里昂。液体 CO<sub>2</sub> 的临界温度为 31℃,临界压力为  $72 \times 10^6$  Pa,是目前普遍采用的媒介液。

脱水剂与液体 CO<sub>2</sub> 的互溶性很差,因此在干燥前,须用一种中间液置换脱水剂。中间液需对液体 CO<sub>2</sub> 和脱水剂都有很好的互溶性,一般都选用醋酸异戊酯作为中间液。置换只需将脱水后的样品在醋酸异戊酯中置 15~30 min 即可。



临界点干燥在临界点干燥仪中进行。临界点干燥仪示意图如图 2。

临界点干燥按下述步骤进行：

把经过置换处理的样品，装入不锈钢样品篮，再把样品篮放进预冷过的临界点干燥仪的样品室，盖紧样品室盖。

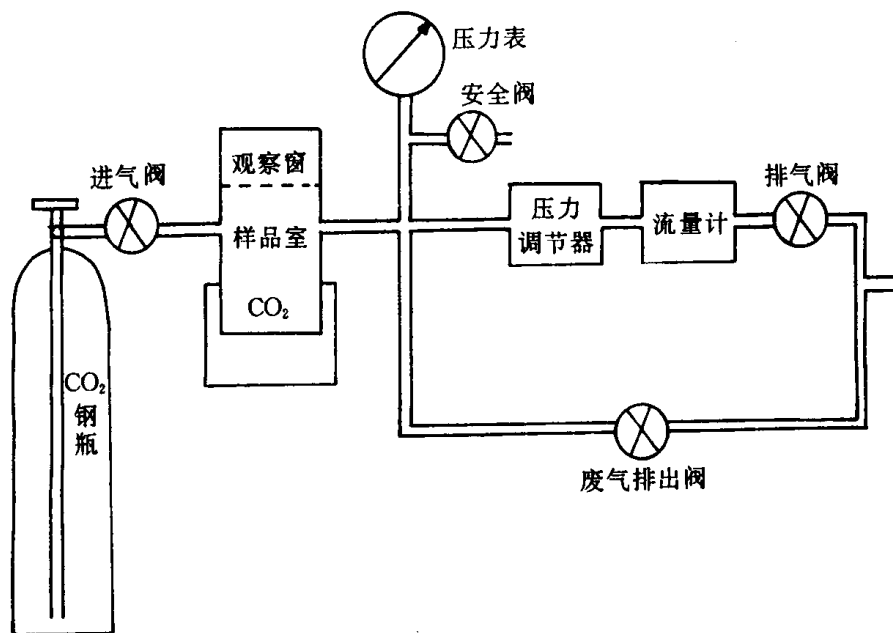


图 2 临界点干燥仪示意图

打开进气阀门，在  $0\sim 10^{\circ}\text{C}$  下，充入液体  $\text{CO}_2$ ，使液面高于样品篮。缓慢排出气体  $\text{CO}_2$ ，直到样品室内尚余少量液体  $\text{CO}_2$ ，能保持样品湿润为止。重复充液、排气 2~3 次后，关闭进气阀门，完成  $\text{CO}_2$  置换中间液醋酸异戊酯的过程。

继续向样品室充入液体  $\text{CO}_2$ ，液体  $\text{CO}_2$  占样品室的 70% 空间后，关闭进气阀门。将样品室温度控制钮调至  $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ ，并持续 10 min，压力可至  $5.9\times 10^6\text{ Pa}$  以上。使样品室温度升高至  $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ ，此时随温度升高，样品室内压力也逐渐增大，样品室内  $\text{CO}_2$  呈混浊状时，表明已达临界状态。当压力达  $9.8\times 10^6\text{ Pa}$  时，再经 5 min，即可排气。在保持临界状态条件下，打开放气阀门，以  $0.4\text{ L/min}$  的速度缓慢放出气体。约经 45~60 min 后，排气完毕，样品室压力下降到零，将温度调节至室温约 5 min 后，即可打开样品室盖，取出干燥的样品。

### 三、镀膜

镀膜是在样品表面镀上一层导电膜，增加样品的导电性，以符合扫描电镜对生物样品的要求。一般常用离子溅射仪 (ion sputter apparatus) 镀膜。离子溅射仪是在低真空条件下，使仪器真空罩内气体电离产生的阳离子冲击阴极的金属靶，使部分金属原子被溅射出来，飞向位于阳极的样品上，从而使样品表面均匀地镀上一层金属膜 (图 3)。

用少量导电胶或双面胶带，将已干燥的样品粘在扫描电镜样品台上。

打开离子溅射仪的真空罩，放入样品台后，盖上真空罩。根据金属靶的类型，选择适当的电压、真空度和镀膜时间进行离子溅射镀膜。

经以上步骤制作的样品即可用扫描电镜观察。